动 物 学 研 究 2006, Apr. 27 (2): 209-215 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

"两步法"体外培养山羊卵母细胞的超微结构观察

邵 华[1], 孟和宝力高[2], 其木格[3], 张锁链[1], 旭日干[1,*]

(1. 内蒙古大学 哺乳动物生殖生物学与生物技术教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021;
2. 中国人民解放军第二五三医院 免疫中心, 内蒙古 呼和浩特 010021; 3. 内蒙古医学院 电镜室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: 有假说认为, 卵母细胞在体外培养过程中, 如果延长GV期, 可促进卵母细胞进一步成熟, 因而提高发育潜能。采用山羊半卵泡和卵母细胞共培养, 抑制卵母细胞GVBD发生, 从而延长GV期。比较了共培养前后和恢复成熟培养后卵母细胞的超微结构变化, 其目的从亚细胞水平寻找卵母细胞进一步成熟的证据。研究发现, 常规成熟培养: 有卵周隙存在, 但不贯通, 局部区域卵膜与透明带结合紧密; 部分皮质区尚有细胞器存在; 微绒毛大部分从透明带中撤出, 倒伏于质膜表面, 数量较多, 形态较为粗大; 皮层颗粒质膜下部分单层分布, 部分散布于皮质区; 线粒体均匀散布于卵质中央区。共培养前: 卵母细胞的卵周隙尚未形成, 微绒毛没有从透明带中撤出; 线粒体等细胞器分布于皮质区, 皮层颗粒成簇状分布, 皮质区富含细胞器。共培养后: 局部形成卵周隙, 微绒毛已自透明带中撤出, 数量较多, 垂直或倒伏于卵膜表面; 线粒体以簇状分批开始内移, 皮层颗粒已部分单层分布于质膜下, 部分皮质区缺乏细胞器。恢复成熟培养后: 卵周隙进一步扩大并且贯通, 微绒毛数量减少并且绝大多数垂直于卵膜; 线粒体在卵质中央区均匀分布, 皮层颗粒卵膜下单层分布, 大部分皮质区无细胞器存在。利用"两步法"培养得到的卵母细胞与体外常规成熟培养的卵母细胞相比, 更有利于皮层颗粒的质膜下单层分布, 卵母细胞卵周隙的形成与贯通, 微绒毛数量减少和垂直于卵膜表面, 无细胞器皮层区的进一步形成。因此, 更有利于卵母细胞胞质的进一步成熟。

关键词: 山羊; 卵母细胞; 两步法; 半卵泡; 共培养; 透射电子显微镜; 超微结构
中图分类号: S858.27; S852.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2006)02-0209-07

Ultrastructure of Goat Oocytes Cultured with "Two-step" Protocol

SHAO Hua[1], MENG Hebaoligao[2], QI Mu-ge[3], ZHANG Suo-lian[1], BOU Shor-gan[1,*]

(1. *Ministry of Education Key Laboratory for Mammal Reproductive Biology and Biotechnology, Inner Mongolia University, Huhhot* 010021, *China*;
2. *The Center for Immunology, the* 253*th Hospital, Huhhot* 010021, *China*;
3. *The Center for Electron Microscope, Inner Mongolia Medicine College, Huhhot* 010021, *China*)

Abstract: It is hypothesized that if oocyte can be cultured *in vitro* under condition that maintains meiotic arrest at the germinal vesicle (GV) stage, then they may have the opportunity to acquire greater developmental competence. In this study, goat oocytes were cultured within follicle hemi-sections, which can inhibit GVBD and prolong the duration of GV stage. The changes of ultrastructure of goat oocyte before and after co-culture with follicle hemi-section and after resumption culture were observed. The purpose is to find out the proofs of further capacitation of oocytes, and to observe the feasibility of two-step protocol for oocytes maturation. Before co-culture with follicle hemi-section: perivitelline space have not been formed in the oocyte, neither have the microvilli been released from the zona pellucida, the cortical region have a lot of oraganelles, clusters of cortical granules exit in the cortical region, mitochondrias amass in the cortical region, a number of vacuoles are presented. After co-culture with follicle hemi-section, the results are as follows: perivitelline space is obvious, the microvilli have been released from the zona pellucida and pile up in stacks in the perivitelline space, mitochondria have begun to migrate toward the center of oocyte inclusters, the bulk of the cortical granules are distributed at solitary positions along the oolemma in the part, the number of vacuoles increase obviously, part of cortical region lack organelles. After resumption culture: perivitelline space develops further, the number of microvilli stacks have decreased

* 收稿日期: 2005-10-18; 接受日期: 2006-01-09
基金项目: 国家"863"计划资助项目(2002AA242061)
* 通讯作者(Corresponding author), 博士, 教授, 中国工程院院士, Tel: 0471-4992443, E-mail: xrg@mail.imu.edu.cn

and become more erect, mitochondria have distributed evenly in the central oolemma, cortical granules are distributed at solitary positions along the oolemma, the number of vacuoles decrease obviously, more parts of cortical region are free of organelles. In contrast to maturation *in vitro*, inhibition culture by follicle hemi-section contributes more to the formation of perivitelline space, decrease of number and erection of microvilli and the further formation of organelle-free cortex.

Key words: Goat; Oocytes; "Two-step" protocol; Follicle hemi-section; Co-culture; Electron microscope; Ultrastructure

尽管家畜体外受精技术的研究已有20多年的历史，而且也已开始应用于生产，但体外受精胚的发育率以及移植后的妊娠率与体内胚相比都较低，这其中最大的制约因素之一就是卵母细胞的体外成熟质量不高。卵母细胞的成熟质量也严重制约着诸如克隆动物、转基因动物等相关生物技术的研究与开发。卵母细胞的成熟包括两个方面，核成熟与质成熟。核成熟程度是目前评价卵母细胞成熟质量的一个重要指标，易于观察和记录。与之相比，卵母细胞的质成熟就要复杂得多，主要包括卵母细胞内部各细胞器形态改变和功能建立以及供减数分裂与早期胚胎发育的mRNA转录、翻译与修饰。Dieleman & Bevers（1993）发现，采集牛卵巢上的优势卵泡及2~6 mm卵泡卵母细胞，在同样成熟培养条件下，受精后的囊胚发育率分别为50%和30%，差异显著。一般而言，在体外受精实验中，用于成熟培养的卵母细胞基本上是采自卵泡表面2~6 mm卵泡，这一时期的卵母细胞胞质成熟程度较低。在体内，卵母细胞胞质的进一步成熟是在卵泡内进行的，此时，由于卵泡分泌的各种抑制核成熟因子的存在，卵母细胞的核一直处于生发泡期（GV期），而当卵母细胞从卵泡内释放出来后，卵子能够自发恢复减数分裂。因此，有的学者提出假说，在体外如果延长生发泡期，那么卵母细胞胞质可以进一步成熟，从而有可能获得更大的发育潜能。目前常用于抑制卵母细胞核成熟的化学试剂有：cAMP类似物（Sirard，1990）、PDE抑制剂（Eppig & Downs，1984）、forskolin（Bilodeau et al，1993）、dbcAMP（Cho et al，1974）等；但是这些化学物质对卵母细胞的核成熟的抑制作用是暂时的，不能长时间维持。次黄嘌呤虽然能够有效地抑制小鼠、猪的卵母细胞核成熟（Xia，1994），但对牛、羊等大家畜的抑制作用则不十分明显。因此，人们的研究重点开始转向在体外建立一种卵母细胞核成熟的生理抑制模式，通过卵母细胞与卵泡成分的共培养，利用卵泡分泌的抑制性因子来实现。这样，卵母细胞在进行传统成熟培养前都要经过一段时间的核成熟抑制的培养方式，我们称之为"两步法"体外培养。笔者（Shao et al，2002）之前的研究发现，山羊半卵泡可以有效抑制山羊卵子的核成熟。迄今为止，人们对于"两步法"体外培养卵母细胞的评价或停留在推测阶段，或获得较高的囊胚发育率的结果，但都较少地对这一方法的本质进行过探讨。本研究采用电子显微镜对共培养前后、恢复成熟培养后的山羊卵母细胞内各亚细胞结构发生的变化进行系统描述，并与体外常规成熟培养的卵子的超微结构变化进行对比，以期获得"两步法"体外培养卵母细胞在亚细胞水平上的证据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

CO_2培养箱（SANYO）、立体显微镜（NIKON）、玻璃器皿、细菌滤器（华美公司）。配制培养液均用六蒸水。所用药品除特殊标明外均为常规分析纯试剂。实验用山羊卵巢采自呼和浩特市屠宰场。共培养用培养液：M199（Gibco）、10% FCS（本实验室自制）、0.12 mg/mL丙酮酸钠（日本和光药业）、10 mmol/L Hepes（日本和光药业）、双抗（日本和光药业）；卵子恢复成熟培养液：M199、10% FCS、3 IU/mL HCG（宁波激素制品厂）、1 μg/mL 雌二醇（SIGMA）、10 mmol/L Hepes、双抗。

1.2 卵巢的采集及卵母细胞的成熟培养

从屠宰场采集山羊卵巢，于30 ℃生理盐水中保温1~2 h内带回实验室，采卵前37 ℃生理盐水洗3遍，切开卵巢表面2 mm（1.2~2.5 mm）大小的卵泡，用药勺挖出其内容物，放入37 ℃含BSA的PBS缓冲培养，培养小滴为10~20个卵子/50 μL，培养时间为24 h。用石蜡油覆盖。培养温度为38.5 ℃，气相条件是，5% CO_2、95%空气、湿度为100%。

1.3 半卵泡的制备及与卵子的共培养

解剖镜下选取大小为2 mm（1.2~2.5 mm）、表面分布有丰富血管、半透明的卵泡在含PBS的培

养皿内，用不锈钢手术刀片沿卵泡中央将卵泡一切为二，用玻璃吸管轻轻吸出卵泡自身的 COCs，弃掉。用镊子轻轻夹住半卵泡用预平衡的清洗 3 遍，置于预平衡的培养小滴中培养 2 h，每小滴培养半卵泡一个，小滴体积 100 μL。而后在每个半卵泡内培养 5 ~ 8 个 COCs。共培养时间为 24 h，之后转入成熟培养小滴，培养时间为 24 h。培养温度为 38.5 ℃，气相条件是 5% CO_2、95% 空气、湿度为 100%。

1.4　山羊卵子的固定、包埋与超薄切片的制备

收集刚刚采自卵巢表面卵泡的和未经共培养和成熟培养的山羊卵子（0 h C，0 h M）、未经共培养而直接进行成熟培养的卵子（0 h C，24 h M）、经共培养而未经成熟培养的卵子（24 h C，0 h M）、经共培养和成熟培养的卵子（24 h C，24 h M），以上 4 种方式的卵子经 3%戊二醛固定，4 ℃冰箱保存，待收集齐后经二甲申酸钠缓冲液清洗，后用 1%四氧化锇后固定 1 h，再用巴比妥缓冲液清洗，然后用 50、60、70、80、90、100% 的梯度乙醇脱水处理，最后用 Epon812 包埋，包埋块在 48 ℃条件下聚合 24 h 后，在 60 ℃条件下聚合 48 h。LKBJ 型超薄切片机制备 500 超薄切片，然后醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色，H700H 日立电子显微镜观察拍照。

2　结　果

2.1　共培养前的卵母细胞

无卵周隙；皮质区富含细胞器；微绒毛与透明带结合紧密，尚未从透明带中撤出，微绒毛与颗粒细胞突起间有明显的缝隙连接存在；皮质颗粒成簇状分布于皮质区；线粒体主要集中分布于皮质区，细胞核周围也有少量存在，形态多为帽状。

2.2　共培养后的卵母细胞

卵周隙已经形成，但空间较窄；皮质区细胞器开始向中央区移动，局部区域无细胞器的存在；微绒毛已自透明带中撤出，并垂直或倒伏于卵膜表面，形态较细小，数量较多；部分皮层颗粒已单层分布于质膜下，部分以簇状存在于皮质区近卵膜处；线粒体自皮质区开始以簇状分批向中央区迁移，形态不规则，有帽状、球形、棒状、哑铃形等几种，已进入中央区的线粒体开始逐步散开。

2.3　恢复成熟培养后的卵母细胞

卵周隙进一步扩大，并且贯通；大部分皮质区不含细胞器；微绒毛绝大多数垂直于卵膜，形态较细小，数量明显减少；皮层颗粒质膜下单层分布；线粒体均匀散布于卵质中央区，形态以帽状为主。

2.4　常规成熟培养的卵母细胞

有卵周隙存在，但不贯通，局部区域卵膜与透明带结合紧密；部分皮质区尚有细胞器存在；微绒毛大部分从透明带中撤出，倒伏于质膜表面，数量较多，形态较为粗大；皮层颗粒质膜下部分单层分布，部分散布于皮质区；线粒体均匀散布于卵质中央区，形态以帽状为主。

3　讨论与结论

哺乳动物卵母细胞的发育能力是随着卵泡的增大而不断得到提高的，先后经历了生长期、获能期和成熟期。山羊卵泡直径增长到 3 mm 时，其内卵母细胞直径不再增加，立即停止生长而进入获能期。获能期指的是从三级卵泡开始直到 LH 峰出现前这一段时期，其间基因表达处于较低水平，主要发生变化的是卵子内部的超微结构，这一阶段，卵周隙、脂滴、微绒毛、线粒体、皮层颗粒、内质网以及高尔基体，无论在数目、形态、大小还是分布上都要产生变化，而这些变化对于卵母细胞受精以及受精后的早期胚胎发育是十分重要的。

很多研究表明，从输卵管内回收的成熟卵母细胞受精后的胚胎发育率远高于体外成熟的卵母细胞。这一结果可能由于卵母细胞的个体差异和体外成熟培养条件差异等许多因素造成，但 Dieleman & Bevers（1993）将即将出现 LH 峰的母牛屠宰，并采集卵巢上的优势卵泡卵母细胞及 2 ~ 6 mm 卵泡卵母细胞，在同样的成熟培养条件下，受精后的囊胚发育率分别为 50% 和 30%，差异显著。由此可见，卵母细胞发育水平不同或者说卵母细胞获能程度不同是导致差异产生的主要原因。本实验中采用卵母细胞与半卵泡共同培养就是要模拟体内卵泡环境，使卵母细胞内各细胞器及功能大分子在给定时间内尽可能充分地改变及合理分布，以期核质更加趋向于同步成熟。

3.1　微绒毛

山羊卵母细胞的微绒毛产生于原始卵泡向初级卵泡转变的过程中。此时尚未有透明带样物质出现，当卵泡生长到 150 ~ 200 μm 时微绒毛达到最大长度，此时数目也最多，垂直插入透明带内。随着卵泡发育，微绒毛长度略变短，但粗度明显增大，与

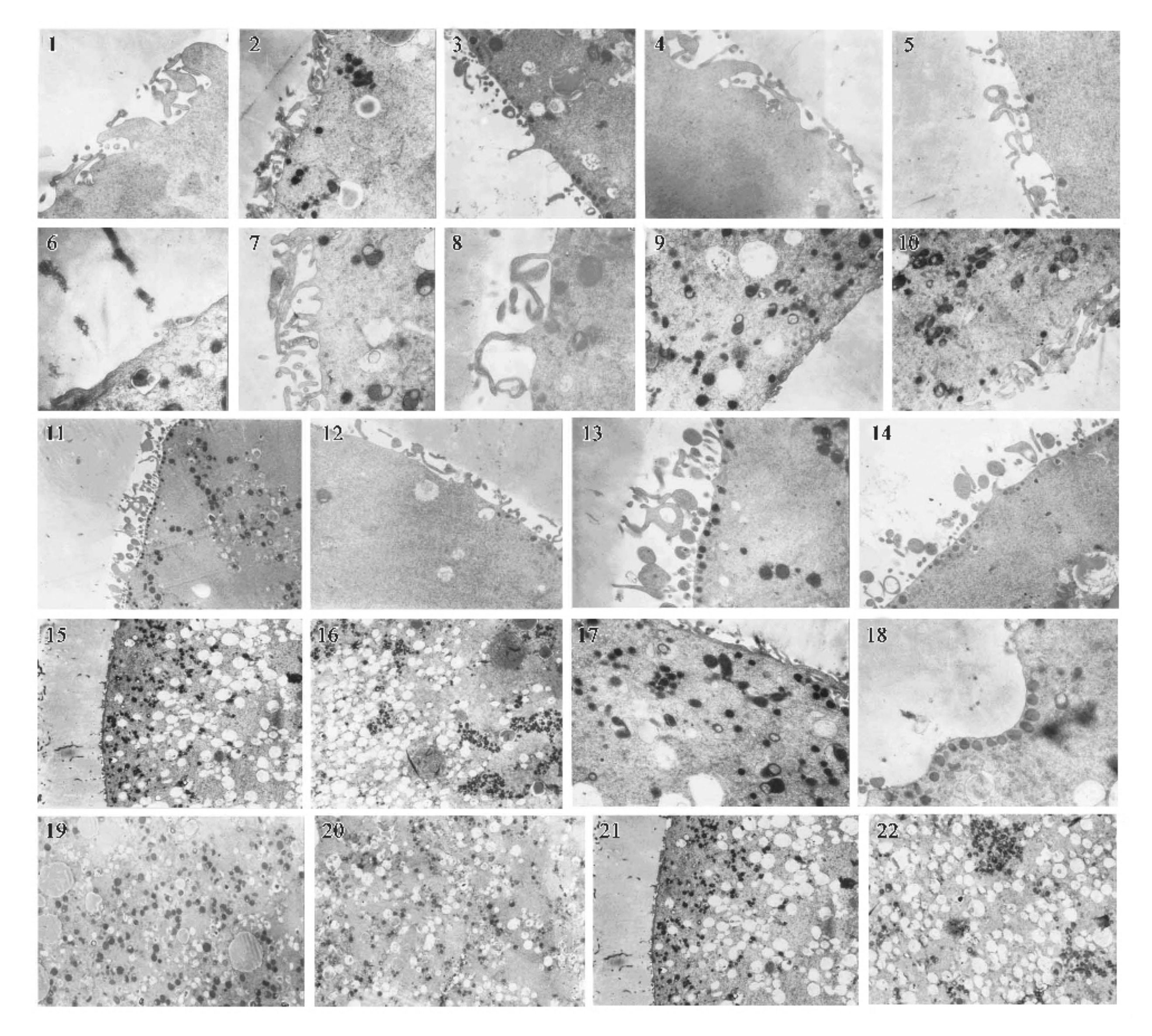


图 1—22 经过“两步法”培养的山羊卵母细胞的超微结构变化

Figs. 1－22 Ultrastructure changes of goat oocytes with “two-step” protocal

1. 常规成熟培养下微绒毛大部分自透明带中撤出，倒伏于质膜表面（0 h C，24 h M：Amass of microvilli evacuated from zona and falling on the surface of oocyte plasmic membrane）×10 000；
2. 共培养后微绒毛自透明带中撤出，垂直或倒伏于卵膜表面（24 h C，0 h M：Microvilli plumbing or falling on the surface of plasmic membrane）×7 000；
3. 恢复成熟培养后微绒毛自透明带中撤出，绝大多数垂直于卵膜表面（24 h C，24 h M：A mass of microvilli plumbing on the surface of plasmic membrane）×7 000；
4. 共培养前微绒毛尚未从透明带中撤出（0 h C，0 h M：Microvilli embedding in zona，not removing from）×18 000；
5. 共培养后微绒毛自透明带中撤出，垂直或倒伏于卵膜表面（24 h C，0 h M：Microvilli plumbing or falling on the surface of plasmic membrane）×12 000；
6. 恢复成熟培养后微绒毛自透明带中撤出，绝大多数垂直于卵膜表面（24 h C，24 h M：A mass of microvilli plumbing on the surface of plasmic membrane）×15 000；
7. 常规成熟培养下卵周隙存在但不贯通（0 h C，24 h M：Formation of perivitelline space，but not transfixion）×10 000；
8. 恢复成熟培养后卵周隙进一步扩大（24 h C，24 h M：Perivitelline space further widened）×10 000；
9. 共培养前卵周隙尚未形成（0 h C，0 h M：No perivitelline space）×10 000；
10. 共培养后卵周隙已经形成，但空间较窄（24 h C，0 h M：Perivitelline space having formed，but the space is narrow）×10 000；
11. 常规成熟培养下大部分皮质区尚有细胞器存在（0 h C，24 h M：Cortical region containing a lot of oraganelles）×3 600；
12. 恢复成熟培养后大部分皮质区不含细胞器（24 h C，24 h M：The mass of cortical region have no oraganelles）×7 000；

13. 共培养前皮质区富含细胞器（0 h C，0 h M：The cortical region having a lot of oraganelles）×3 000；
14. 共培养后皮质区细胞器开始向中央区移动（24 h C，0 h M：Oraganelles in cortical beginning to migrate toward to the center of oocyte）×3 000；
15. 常规成熟培养下皮层颗粒质膜下单层分布（0 h C，24 h M：Cortical granules distributed at solitary positions along the oolemma）×9 000；
16. 恢复成熟培养后皮层颗粒质膜下单层分布（24 h C，24 h M：Cortical granules distributed at solitary positions along the oolemma）×7 000；
17. 共培养前皮层颗粒簇状分布于皮质区（0 h C，0 h M：Clusters of cortical granules exit in the cortical region）×9 000；
18. 共培养后皮层颗粒质膜下单层分布（24 h C，0 h M：Cortical granules distributed at solitary positions along the oolemma）×12 000；
19. 常规成熟培养下线粒体均匀散布于卵质中央区（0 h C，24 h M：Mitochondria have distributed evenly in the central oolemma）×3 600；
20. 恢复成熟培养后线粒体均匀散布于卵质中央区（24 h C，24 h M：Mitochondria have distributed evenly in the central oolemma）×3 600；
21. 共培养前线粒体主要集中分布于皮质区（0 h C，0 h M：Mitochondria amassed in the cortical region）×3 000；
22. 共培养后线粒体自皮质区开始，以簇状分批向中央区迁移，已进入中央区的线粒体，多以簇状存在同时已有部分开始逐步散开（24 h C，0 h M：Mitochondria beginning to migrate toward to the center of oocyte in cluster；these mitochondria，which had arrived at the center，begin to disperse step by step）×3 600。

这一期间处于生长期的卵母细胞进行活跃的代谢过程相适应。当卵泡直径达到 3 mm 左右时，微绒毛变得更短并且弯曲，开始自透明带内撤出，此时卵母细胞结束生长期，进入获能期，同样，微绒毛的这种变化也与此时卵子内部的代谢活动相关。本实验所用卵子全部选取 2 mm（1.5～2.5 mm）大小的卵泡。此阶段卵子（0 h C，0 M）的电镜结果显示，微绒毛大部分尚未从透明带中完全撤出。微绒毛与卵丘细胞突起间有明显的缝隙连接存在。当卵母细胞与半卵泡在体外经 24 h 共培养后（24 h C，0 M），微绒毛完全从透明带中撤出，倒伏在卵膜表面，数目较多，此时有很明显的卵周隙。取出卵泡内卵子进行 24 h 常规体外成熟培养后发现，微绒毛变细且数量明显减少，由倒伏变为直立，垂直于卵膜表面，卵周隙进一步扩大。而卵母细胞体外成熟培养后（0 h C，24 M），微绒毛仅部分从透明带中撤出，倒伏于卵膜表面，直径较为粗大。卵周隙不贯通，局部区域卵膜仍紧贴于透明带。Hyttel et al（2000）认为微绒毛数量的减少以及垂直于卵膜表面是卵母细胞成熟的一个重要特征。我们推测，微绒毛的这种状态可能更有利于精子头部质膜与卵膜的融合，从而影响卵母细胞的受精率。因为，在一般情况下，经顶体反应后，穿过透明带的精子，其头部质膜与卵子发生的融合部位主要位于微绒毛的顶端、侧面或两微绒毛之间，在缺乏微绒毛的部位（如第二极体排出处）不发生融合。Tan（1988）在对不同发育阶段的山羊卵巢卵泡卵母细胞的电镜观察发现，当微绒毛开始向透明带中撤出时，由微丝伸入微绒毛内而形成轴心，微丝基部位于卵皮质中，并认为，微绒毛的抽出是依靠微丝的收缩作用来完成的。当山羊卵泡直径达到 1 mm 左右时，微绒毛开始自透明带中撤出；当直径达到 5 mm 左右时，微绒毛全部撤出。微绒毛自透明带内撤出时逐渐变短变粗。本实验观察到，卵母细胞经 24 h 体外成熟培养后，自透明带中撤出的微绒毛既短又粗，并倒伏于卵膜表面，推测此时微绒毛刚刚从透明带中撤出，可能由于体外培养时间过短而使微绒毛未能充分获得形态改变。比较 24 h C，0 M；24 h C，24 M 与 0 h C，24 M 的卵母细胞膜表面时发现，除微绒毛外，前两种培养方式，卵膜较为圆滑；后者卵膜存在包状突起，我们推测，可能所用体外成熟培养液不完全支持微绒毛获得充分的形态改变或者可能由于微丝收缩作用时间不足造成的，延长作用时间，可能使突起消失，卵膜相应也变得较为圆滑。前面所述体内成熟卵母细胞充分获能后，微绒毛数量减少，是否也是由于微丝的这种收缩机制还有待于进一步实验论证。

3.2　卵周隙

Fleming（1972）证明，牛成熟卵泡卵母细胞于发情早期颗粒细胞突起开始退化，到排卵前 20～10 h 全部退化，并认为，卵周隙的出现与颗粒细胞退化有关，因两者相继发生。Kruip（1983）证明，正常体内成熟牛卵母细胞 LH 峰出现后第一个变化是卵周隙形成和卵丘细胞与卵母细胞联系中断。Hyttle（1987）证明，超排牛卵母细胞于 LH 峰后 9～12 h 发生 GVBD，同时，卵丘细胞突起和卵母细胞间联系中断。他还证明，体外成熟牛卵母细胞于 GVBD 同时，卵丘细胞突起与卵质膜间的联系中断。本实验中，共培养前的卵母细胞微绒毛尚未开始从透明带中撤出，卵丘细胞突起与卵膜联系紧

密，无卵周隙。卵母细胞与半卵泡共培养后（24 h C，0 M），大部分微绒毛已从透明带中撤出，卵丘细胞突起开始退化，局部出现较窄的卵周隙。取自半卵泡的卵子（24 h，24 M）进行体外成熟培养后，卵丘细胞突起完全退化，卵周隙进一步扩大。由此可见，半卵泡作为抑制因素进行“两步法”体外培养卵母细胞能够再现卵周隙的体内发生。当卵母细胞直接经体外成熟培养后，仅部分卵丘细胞突起退化，局部形成卵周隙并且不贯通。在正常受精条件下，精子的头部优先进入卵周隙并于卵膜紧密结合，推动卵子在卵周隙内发生转动，从而引导精子尾部进入。因此，我们推测，体外成熟卵母细胞受精率偏低的原因之一可能是由于卵周隙不贯通而影响到精子的正常受精活动，并最终使受精卵的融合受到影响。

3.3 皮层区

Tan（1988）在对体内不同发育阶段的山羊卵泡卵母细胞的超微结构研究中发现，由于卵子内不同区域的代谢强度不同，造成各种细胞器及内含物的分布呈现规律性变化。原始卵泡卵母细胞细胞器多分布于胞质的近核区。当卵泡大小达到 80～200 μm 时，其内卵母细胞的各种细胞器在胞质中均匀分布。卵泡生长到 0.5～1.0 mm 时，其内卵母细胞中的各种细胞在胞质中散在分布，但皮质区数量较多，生发泡周围几乎无细胞器。1.5～3 mm 大小的卵泡卵母细胞胞质中大多数细胞器分布在皮质区，中央区细胞器很少，细胞器的这一分布一直持续到 5 mm 大小卵泡。线粒体等细胞器从皮质区向中央区内移始自于 5 mm 以上卵泡的卵母细胞。当卵母细胞到达 MII 时，各种细胞器完全均匀分布于中央区。形成一个无细胞器的皮质区。本实验所采用的卵泡大小为 2 mm 左右，其内卵母细胞皮质区含有丰富的线粒体、脂滴等细胞器。当与半卵泡体外共培养 24 h 后发现，线粒体开始成簇状向中央区内移。取自半卵泡的卵母细胞体外成熟培养 24 h 后，电镜观察显示，大部分皮质区缺乏细胞器。作为对照，卵母细胞直接经体外成熟培养后的电镜结果表明，皮质区的细胞器虽然已经开始向中央区内移，但大部分区域仍然含有较多的细胞器与内容物。Loos et al（1992）比较研究了牛体内成熟与体外成熟卵的超微结构，结果显示，体内成熟卵皮质区完全缺乏细胞器，而体外成熟卵没有形成一个无细胞器存在的皮质区，但他并没有进一步说明，体外成熟卵的细胞器内移上的滞后对随后的受精及早期胚胎发育的影响。我们认为，细胞器的内移发生于卵母细胞的获能期，此时的卵母细胞核及核仁的基因表达基本消失，主要进行各种细胞器的形态、数目、大小及分布上的调整。体内卵母细胞各细胞器的内移始自 5 mm 大小卵泡卵细胞，终止于 MII 期，这使得体内成熟卵母细胞有充足的时间进行各种调整，充分合理地建立各细胞器在代谢功能上的联系。而体外成熟卵母细胞可能由于培养系统不完全支持各细胞器功能联系的建立或者说可能由于体外培养时间不足而造成代谢功能联系上的滞后，从而最终对卵母细胞的受精及早期胚胎的发育产生影响。有人认为，卵子的体外成熟培养时间在传统 24 h 基础上再延长几小时（2～3 h），有利于囊胚发育率的提高。Sirand（1996）报道，卵巢取回后，在采卵前温育几个小时，可以提高囊胚发育率。以上实验说明几个小时的延长或温育使得卵母细胞获能时间得到延长，使其超微结构及分子结构得以更加充分成熟，使核质成熟更加趋向于同步，从而提高了体外成熟卵母细胞的质量。我们在实验中所采用卵母细胞与半卵泡共同培养，就是基于这一目的。

3.4 皮层颗粒

皮层颗粒是未受精卵母细胞的特征结构，由单层膜包被，在卵母细胞成熟晚期单层分布于质膜下，这种单层分布对防止多精受精及胚胎的正常发育有重要意义。Hyttel et al（1986）的实验证明，超排牛卵母细胞皮层颗粒于 LH 峰后 21～22 h 分散并排列在质膜下。孙青原证明，加激素（FSH 和 LH）培养 24 h，牛卵母细胞皮层颗粒分散排列于质膜下。Loos et al（1992）等发现，体内成熟牛卵母细胞皮层颗粒单层分布于质膜下，而体外培养 24 h 的牛卵母细胞局部有尚未散开的小簇皮层颗粒存在。本实验观察到，当卵母细胞与半卵泡经 24 h 共培养后，局部已经出现皮层颗粒的单层分布，虽然此时也有成簇状皮层颗粒存在。共培养所采用的培养液中未添加任何生殖激素。因此，我们推测，CGs 的单层分布可能是卵母细胞经过一系列充分获能的结果，而不是由 LH 激发形成的。经过 24 h 恢复成熟培养的卵母细胞的电镜观察结果显示，皮层颗粒全部在质膜下单层分布，而经过常规成熟培养的卵母细胞的皮层颗粒大部分质膜下单层分布，一小部分以簇状形式存在于皮质区。由此可见，半卵泡作为抑制因素进行“两步法”体外培养卵母细胞

比常规成熟培养，更有利于皮层颗粒质膜下单层分布。

3.5　线粒体

线粒体是细胞内的能量供给场所，其位置的变化可造成卵质内不同区域 ATP 水平的不同。在静止期卵母细胞中，线粒体全部聚集在生发泡周围，可为核内 RNA 的转录及局部胞质的翻译提供必要的能量。卵母细胞生长期的线粒体外移及增殖为细胞内蛋白质的合成及分泌，卵母细胞与颗粒细胞间的物质交换和信息交流等各种活动提供能量。特别是，位于外周的线粒体可有效地截获由外界环境直接经质膜或间接经卵丘细胞突起进入卵母细胞的分子。到卵母细胞接近成熟时，由于卵母细胞与卵丘细胞间联系中断，皮质区内代谢活动明显下降，线粒体势必要移向中央。本实验观察到，卵母细胞与半卵泡经 24 h 共培养后，线粒体向皮层区开始内移，内移方式采取簇状分批迁移，到半卵泡内卵子继续进行 24 h 成熟培养后，线粒体均匀分布于卵质中央区。体内成熟卵母细胞的线粒体自外周皮层区内移采取何种方式还未见报道，所以目前尚不能确定线粒体成簇分批迁移是否是体内生长卵母细胞内移方式的再现。

综上所述，与体外常规成熟培养的卵母细胞相比，"两步法"培养卵母细胞更有利于支持皮层颗粒质膜下单层排列、卵周隙的形成与贯通、微绒毛直立和数量较少以及线粒体在胞质中央区的均匀分布，以及无细胞器皮质区的进一步形成，而以上几个亚细胞结构的这些形态和分布特征是卵母细胞胞质成熟的重要标志。因此，认为以山羊半卵泡为抑制成分，采用"两步法"培养山羊卵母细胞比常规成熟培养，更能促进山羊卵母细胞胞质的成熟。

参考文献：

Bilodeau S，Fortier MA，Sirard MA. 1993. Effect of adenylate cyclase stimulation on meiotic resumption and cyclic AMP content of zona-free and cumulus-enclosed bovine oocytes *in vitro* [J]. *Reprod Fertil*, **97** (1): 5 - 11.

Cho WK，Stern S，Biggers JD. 1974. Inhibition effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation *in vitro* [J]. *Exp Zool*, **187** (3): 383 - 386.

Dieleman SJ，Bevers MM. 1993. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle [J]. *Mol Reprod Dev*, **36** (2): 271 - 273.

Eppig JJ，Downs SM. 1984. Chemical signals that regulate mammalian oocytes maturation [J]. *Biol Reprod*, **30** (1): 1 - 11.

Flemming WN. 1972. Fine structure of the bovine oocytes from the mature graafian follicles [J]. *Reprod Fertil*, **29** (4): 203 - 207.

Hyttel P，Laurincik J，Rosenkranz CH，Rath D，Niemann H，Ochs RL，Schellander K. 2000. Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed *in vivo* [J]. *Biol Reprod*, **63** (6): 1848 - 1856.

Hyttel P. 1987. Bovine cumulus oocyte disconnection *in vitro* [J]. *Anat Embryol*, **176** (1): 41 - 44.

Hyttel P，Xu KP，Smith S，Greve T. 1986. Ultrastructure of *in vitro* maturation in cattle [J]. *Reprod Fertil*, **78** (2): 615 - 625.

Kruip TA. 1983. Structureal changes in bovine oocytes during final maturation *in vivo* [J]. *Gamete Res*, **8** (1): 29 - 36.

Loos F，Maurik P，Beneden T，Kruip TA. 1992. Ultrastructural aspects of bovine oocyte maturation *in vitro* [J]. *Mol Reprod Dev*, **31** (3): 208 - 214.

Shao H，Meng HBLG，Zhang SL，Bou SRG. 2002. "Two-step" Protocol for oocytes maturation *in vitro* [J]. *Acta Sci Nat Univ Nei Mongol*, **33** (5): 546 - 551. [邵　华，孟和宝力高，张锁链，旭日干. 2002. "两步法"体外培养山羊卵母细胞的初步研究. 内蒙古大学学报，**33** (5): 546 - 551.]

Sirard MA. 1990. Temporary inhibition of meioses resumption *in vitro* by adenylate cyclase stimulation in immature bovine oocytes [J]. *Therigenology*, **33** (3): 757 - 768.

Sirard MA. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle [J]. *Anim Reprod Sci*, **42** (2): 417 - 426.

Tan JH. 1988. Research for goat oocytes [D]. Ph. D. thesis，Eastnorth Agriculture University. [谭景和. 1988. 山羊卵子的研究. 东北农学院博士研究生论文.]

Xia GL. 1994. Cumulus cell secrete a meiosis-induing substance by stimulation with forskolin and dbcAMP [J]. *Mol Reprod Dev*, **39** (1): 17 - 24.